© Biologiezentrum Linz/Austria; download unter www.biologiezentrum.at

Denisia 13 | 17.09.2004 | 423-434

Aspekte der Arzneimittelempfindlichkeit von Malariaerregern[1]

W.H. WERNSDORFER & G. WERNSDORFER

Abstract: Aspects of the drug sensitivity of malaria parasites. — Resistance of *Plasmodium falciparum* to one or more antimalarial drugs has reached all areas endemic for this parasite, with the exception of America north of the Panama Canal. Even in large parts of tropical Africa the efficacy of chloroquine has decreased to a point that pyrimethamine/sulfonamide combinations have to be adopted for first-line treatment, albeit in the face of rapidly upcoming resistance to these drugs as well. A better understanding of the mechanisms and the causation of resistance, and the avoidance of unnecessary drug pressure would go a long way to stave off the advent of resistance to ever new drugs. The monitoring of the drug response of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* is an essential tool for the orientation of an effective drug policy that should incorporate the principles of rational antimalarial therapy. The low cost of chloroquine and pyrimethamine/sulfonamide combinations has encouraged their haphazard use. Further therapeutic options are expensive and should be an incentive to introduce rational therapy, foremost diagnosis-based treatment and post-therapeutic follow-up of the patients, complemented by regular monitoring of drug sensitivity and periodic updating of the antimalarial drug policy.

Key words: malaria, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, drug response, drug resistance.

Entwicklung der medikamentösen Therapie der Malaria

Phylogenetische Erkenntnisse deuten auf eine schon vor der Entstehung der Hominiden bestehende Assoziation zwischen Primaten und Plasmodien hin. Mit der Entwicklung bis zum *Homo sapiens* ging offenbar innerhalb des Subgenus *Plasmodium* (*Plasmodium*) die Entwicklung hochgradig stenoxenischer, lediglich auf den Menschen beschränkter Plasmodien einher, von welcher *Plasmodium vivax* und *Plasmodium ovale* zeugen. Selbst bei den Angehörigen des phylogenetisch jüngsten Subgenus *Plasmodium* (*Laverania*) zeigen die beiden bisher bekannten Spezies, *Plasmodium* (*Laverania*) *reichenowi* und *Plasmodium* (*Laverania*) *falciparum* monospezifische Stenoxenie. Nur *Plasmodium malariae*, der älteste und wohl am besten adaptierte Malariaparasit findet sich gleichermaßen bei Menschen und anderen Primaten. Atavismen besonderer Art sind natürlich übertragene menschliche Infektionen mit *Plasmodium knowlesi* und *Plasmodium cynomolgi cynomolgi*, Plasmodienarten welche normalerweise bei Makaken vorkommen.

Die Entwicklung der kognitiven Fähigkeiten des *Homo sapiens* dürfte schon sehr früh dazu geführt haben, Mittel gegen Krankheit zu suchen, wobei die Empirie vor allem den Weg der Herbalmedizin beschritten hat und mystische Vorstellungen die Kulthandlungen geprägt haben (WERNSDORFER & WERNSDORFER 1991). Freilich fehlt uns von den frühesten Erfahrungen der Herbalmedizin jegliche Kunde. Der erste Hinweis auf eine Gruppe von Pflanzen, welche auch in die Malariabehandlung Eingang gefunden haben stammt aus dem Pharaonenreich, wo Isispriester zu Festlichkeiten Zweige von *Artemisia absinthium* getragen haben (JARETZKY & GEITH 1944). *Artemisia annua* LINNÉ, deren Inhaltsstoff Artemisinin innerhalb der vergangenen zwei Jahrzehnte Bedeutung als Ausgangsstoff für die semisynthetische Herstellung hochwirksamer Blutschizontozide gewonnen hat, wurde erstmals in China 168 v.Chr. unter dem Namen Qing Hao in den „Rezepten für 52 Arten von Krankheiten" erwähnt. Allerdings fehlte damals noch der Bezug auf fieberhafte Krankheiten. Dieser datiert von 340 AD als Ge Hong *Artemisia annua* als Malariamittel in sein Handbuch für Notfallbehandlungen aufgenommen hat (CHINA COOPERATIVE RESEARCH GROUP 1982). Ob-

[1] Vor über 30 Jahren lernten wir den Jubilar kennen und schätzen. Seither oft wiederholte und interessante Begegnungen und Gespräche haben die Achtung vertieft. Der gemeinsame Nenner war und ist seine Betrachtungsweise der vielfältigen Interaktionen in der lebenden Natur und ihrem Substrat, welche ein universelles und humanistisches Weltbild widerspiegelt. Auch seine Meisterschaft der deutschen Sprache sollte nicht nur uns beiden ein Vorbild sein. Zum 65. Geburtstag wünschen wir Herrn Univ.-Prof. Dr. Horst Aspöck von ganzem Herzen alles Gute und weiterhin ungebrochene Schaffenskraft zum Gedeihen der Wissenschaft und zum Wohle künftiger Generationen von Parasitologen. In diesem Sinne widmen wir diesen Beitrag unserem Freund Horst Aspöck.

© Biologiezentrum Linz/Austria; download unter www.biologiezentrum.at

gleich *Artemisia annua* als Heilkraut später in verschiedenen europäischen Arzneibüchern als Febrifug geführt wurde, muss die Wirksamkeit bei der Malaria im Hinblick auf die Anwendungsweise bezweifelt werden.

Das erste praktisch wirksame Malariamittel war die im frühen 17. Jahrhundert Europäern bekanntgewordene „Chinarinde", welche ihren Namen einer Kette von Missverständnissen verdankt. Chinarinde ist die Rinde von Bäumen des Genus *Cinchona*, deren ursprüngliches Vorkommen sich auf Südamerika beschränkt. Die Rinde war den lokalen Einwohnern schon vor der Ankunft der ersten Europäer als Arznei gegen Fieber bekannt. Sie erlangte weltweite Bedeutung nachdem die Gräfin von Quinhon, die Frau des damaligen spanischen Vizekönigs von Peru, mittels Chinarinde von ihrer Malaria kuriert wurde. Bald wurde die Chinarinde zu einem wichtigen Handelsgut, und verschiedene europäische Mächte legten in ihren malariageplagten Kolonien *Cinchona*-Plantagen zur Gewinnung der Rinde an, wobei *Cinchona ledgeriana* wegen ihres hohen Gehalts an *Cinchona*-Hauptalkaloiden der Vorzug gegeben wurde. Da die Einnahme der kurativen Mengen der Rinde seitens der Patienten auf Schwierigkeiten stieß, arbeiteten Chemiker schon bald an der Extraktion und Isolierung der Wirkstoffe und in den Jahren 1820 und 1821 gelang es alle vier Hauptalkaloide von *Cinchona* in reiner Form zu erhalten. Chinin ist das mengenmäßig vorherrschende Alkaloid, gefolgt von Chinidin, Cinchonin und Cinchonidin. Seit 1830 ist die Chinarinde nicht mehr in Gebrauch und nur mehr Rohstoff zur Gewinnung der therapeutisch angewandten Rein- oder Mischalkaloide.

Es stellte sich allerdings bald die Frage der spezifischen Wirkung der verschiedenen *Cinchona*-Alkaloide. Deren Klärung erfolgte 1866-1868 in Madras im Zuge der ersten klinischen Prüfung der einzelnen Reinalkaloide bei 3617 „Malariapatienten" (es handelte sich um klinisch als Malaria klassifizierte Krankheitsbilder, da die Malariaerreger zu diesem Zeitpunkt noch nicht entdeck waren). Hierbei zeigten sich alle vier Alkaloide gegen die Malaria wirksam, wobei Chinidin und Cinchonin möglicherweise besser abschnitten als Chinin (MADRAS CINCHONA COMMISSION 1870). Diese Ergebnisse gerieten bald in Vergessenheit, bis GIEMSA & WERNER (1914) die Überlegenheit von Chinidin gegenüber Chinin experimentell am *Plasmodium cathemerium* / Kanarienvogel Modell nachweisen konnten. Zu diesem Zeitpunkt waren jedoch die Weichen bereits gestellt, da alles verfügbare Chinidin schon von den Kardiologen mit Beschlag belegt worden war.

Mit der Entdeckung der ersten humanpathogenen Plasmodiumspezies durch LAVERAN im Jahre 1880 konnte schließlich die spezifische Wirkung von Chinin und *Cinchona*-Gesamtextrakten bei der Malaria bestätigt werden. Die ersten Berichte über Resistenz von *Plasmodium falciparum* gegenüber Chinin stammen aus Brasilien (NEIVA 1910; NOCHT & WERNER 1910). Allerdings sprachen die Fälle schließlich auf wiederholte Therapie mit Chinin an, wobei die mittlerweile entwickelte stammspezifische Immunität der Patienten zum Behandlungserfolg beigetragen haben dürfte. Die zu Beginn des ersten Weltkriegs aufkommenden Bemühungen zur Entdeckung und Entwicklung synthetischer Malariamittel sind weniger auf eine drohende Ausbreitung der Chininresistenz zurückzuführen oder die Schaffung besser verträglicher Medikamente ausgerichtet, sondern auf das Bestreben, von Importen aus überseeischen Produktionsgebieten unabhängig zu werden. Das erste synthetische Malariamittel, das der Gruppe der 8-Aminochinoline zugehörige Pamaquin, wurde 1928 eingeführt, jedoch blieb seine Verwendbarkeit limitiert, da es nur schwache blutschizontozide Wirkung besitzt. Seine hochgradige Aktivität in der Verhütung von Rückfällen bei Infektionen mit *Plasmodium vivax* wurde erst später bekannt. Von ungleich größerer praktischer Bedeutung war die Entwicklung von Mepacrin (Atebrin), einem Aminoacridin, welches seit 1934 zur Verfügung stand und als Blutschizontozid therapeutisch und in der suppressiven Malariaprophylaxe eingesetzt werden konnte. Allerdings gab es auch bei diesem Medikament Probleme mit der Verträglichkeit.

Während des zweiten Weltkriegs wurde die Suche nach neuen synthetischen Malariamitteln insbesondere in den USA, in Großbritannien und in Deutschland rasch vorwärtsgetrieben. Hierbei stand die Entwicklung gut verträglicher Medikamente mit längerer Halbwertszeit und einfacherem Behandlungsschema im Vordergrund. Das in Deutschland irrtümlich als zu toxisch verworfene Chloroquin – ein 4-Aminochinolin – fand in den USA Beachtung und wurde nach Kriegsende schließlich zum weitest gebrauchten Medikament in Therapie und Prophylaxe. Die 2. Generation der synthetischen Malariamittel umfasste neben Chloroquin auch Amodiaquin, eine ebenfalls den 4-Aminochinolinen zugehörige Mannich-Base, sowie Pyrimethamin und Proguanil, welche als Antagonisten in Folsäurestoffwechsel und Thymidilatsynthese eingreifen.

Chloroquin löste das bis dahin in der Therapie der unkomplizierten Malaria und in der Malariaprophylaxe vorherrschende Mepacrin praktisch innerhalb von 5 Jahren ab. Es ist bemerkenswert, dass zum Zeitpunkt dieses Wechsels noch kein einziger dokumentierter Fall von Mepacrinresistenz aufgetreten war, obgleich das Medikament immerhin schon 2 1/2 Jahrzehnte lang im Einsatz gestanden hatte.

Während die ersten Berichte über Pyrimethaminresistenz bei *Plasmodium falciparum* und *Plasmodium vivax* schon innerhalb von 2 Jahren nach breiterer Verwendung dieses Mittels erschienen sind, sollte es bis 1959 dauern bis die ersten Fälle von Chloroquinresistenz bei *Plasmodium falciparum*, praktisch zeitgleich im thailän-

© Biologiezentrum Linz/Austria; download unter www.biologiezentrum.at

disch-kambodschanischen Grenzgebiet und in Südamerika (Venezuela und Kolumbien), beobachtet wurden (HARINASUTA et al. 1962; MABERTI 1960; MOORE & LANIER 1961). Diese Entwicklung bedrohte die Durchführbarkeit einer wirksamen und gut verträglichen Therapie der Falciparum-Malaria und stimulierte einerseits die Entwicklung von Prüfverfahren zur Ermittlung der Arzneimittelempfindlichkeit, und andererseits die Suche nach Alternativmedikamenten.

Grundlagen der Arzneimittelwirkung und der Arzneimittelresistenz

Die Arzneimittelempfindlichkeit von Plasmodien ist genetisch determiniert (WERNSDORFER 1994). Die asexuellen Individuen natürlicher, noch keinem Arzneimitteldruck ausgesetzter Populationen von *Plasmodium falciparum* zeigen hinsichtlich ihrer Arzneimittelempfindlichkeit eine log-normale Verteilung, welche einer Gauß'schen Kurve entspricht (Abb. 1). Auch bei Klonen von asexuellen Parasiten zeigt sich eine log-normale Verteilung, allerdings innerhalb sehr viel engerer Grenzen, da die Abweichungen vom Mittelwert zunächst allein durch phänotypische Variation bedingt sind. Im Laufe der Zeit wird sich auch bei Klonen infolge von Spontanmutationen eine Verbreiterung der Basis einstellen. Derartige Spontanmutationen erfolgen mit der Frequenz von 10^{-8} bis 10^{-10} (BEALE 1980).

Durch subkurativen Arzneimitteldruck werden zunächst die sensibleren Anteile der Parasitenpopulation beseitigt und die Restitution der Population erfolgt vorwiegend aus deren weniger sensiblen und resistenten Anteilen. Die Verteilung findet schließlich wieder zur Log-Normalität zurück, allerdings mit einer Rechtsverschiebung des Mittelwertes. Wiederholter subkurativer Arzneimitteldruck selektiert zunehmend für die resistenten Populationsanteile und nach Erholung der Parasitenpopulation rückt die log-normale Verteilung in den Bereich solider Resistenz (Abb. 1). Dieser Vorgang kann auch durch einen biologischen Vorteil resistenter Parasiten unterstützt oder beschleunigt werden, wie er bei chloroquinresistenten Populationen von *Plasmodium falciparum* nachgewiesen wurde (WILKINSON 1976; SUCHARIT et al. 1977).

Um eine Elimination der asexuellen, für die Symptomatik der Malaria verantwortlichen erythrozytären Parasitenformen herbeizuführen, müssen die Blutspiegel der blutschizontoziden Arylaminoalkohole der Klasse-1 (4-Aminochinoline) und der Klasse-2 (4-Chinolinmethanole und Lumefantrin) für ausreichend lange Zeit über der effektiven Mindestkonzentration („minimum inhibitory concentration") gehalten werden. Diese effektive Mindestkonzentration ist bei Nichtimmunen mit der Konzentration gleichzusetzen, welche eine Wachstumshemmung von 99 % herbeiführt (EC_{99}). Der Zeitraum, währenddessen die Wirkstoffkonzentration oberhalb der EC_{99} zu halten ist, wird mit der Dauer von 3-4 Blutschizogoniezyklen beziffert (WERNSDORFER 1994). Aus diesen Gegebenheiten folgt, dass subkurativer Arzneimitteldruck vorwiegend durch unzureichende Dosierung, zu große Zeitabstände zwischen den Einzeldosen von Medikamenten mit kurzer Halbwertszeit, oder aber zu kurze Medikationsdauer zustandekommt. Bei oralen Medikamenten mit hohen inter-individuellen Schwankungen der Absorption aus dem Magen-Darmtrakt kann subkurativer Arzneimitteldruck auch bei normalerweise korrekter Anwendung entstehen. Ferner entsteht subkurativer Arzneimitteldruck bei Medikamenten mit langer Halbwertszeit während der post-therapeutischen Eliminationsphase, wenn neu ankommende Parasitenpopulationen unterschwelligen Wirkstoffkonzentrationen ausgesetzt sind. Hierbei ist der Selektionsdruck proportional zu der lokalen Übertragungsrate.

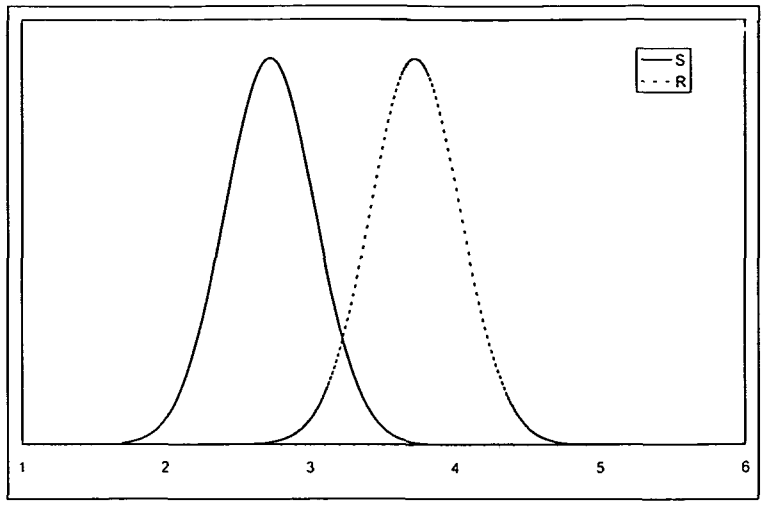

Abb. 1: Schematische Darstellung der log-normalen Verteilung gemäß Mefloquinempfindlichkeit in einer sensiblen (S) und in einer resistenten (R) Population von *Plasmodium falciparum*. Die x-Achse repräsentiert die Logarithmen der Mefloquinkonzentration in nM.

Das eklatanteste Beispiel für subkurativen Arzneimitteldruck war die Verwendung von Kochsalz, welchem Pyrimethamin oder Chloroquin beigegeben war. Dieses Vorgehen wurde in Gebieten praktiziert, in welchen keine Vektorbekämpfung durchgeführt werden konnte. In den Gegenden unter Kochsalz mit Pyrimethaminzusatz stellte sich spezifische Resistenz schon innerhalb von wenigen Monaten ein (MEUWISSEN 1961). Bei der Verwendung von Kochsalz mit Chloroquinzusatz trat Resistenz erst nach längerer Verwendung auf. Es ist jedoch bemerkenswert, dass die ersten Fälle von Chloroquinresistenz sowohl in Südostasien als auch in Südamerika in unmittelbarer Nähe von Projekten beobachtet wurden, in welchen Kochsalz mit Chloroquinzusatz zur Malariabekämpfung eingesetzt worden war (PAYNE 1988).

In Gebieten mit intensiver Malariaübertragung kann auch eine häufig wiederholte, jedoch lückenhafte Medikation von einzelnen Zielgruppen zur raschen Selektion resistenter Populationen führen. So wurde noch vor der

© Biologiezentrum Linz/Austria; download unter www.biologiezentrum.at

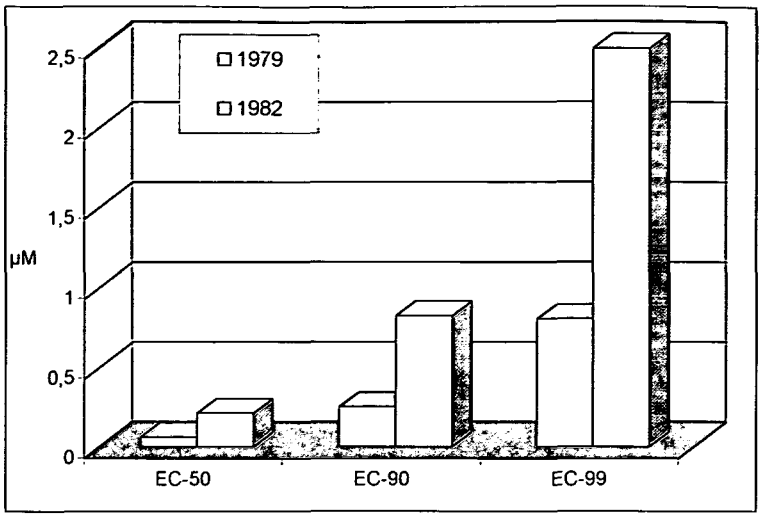

Abb. 2: Vergleich der EC_{50}, EC_{90} und EC_{99} Werte für Chloroquin bei *Plasmodium falciparum* im Distrikt von Nord-Mara, Tansania, 1979 und 1982.

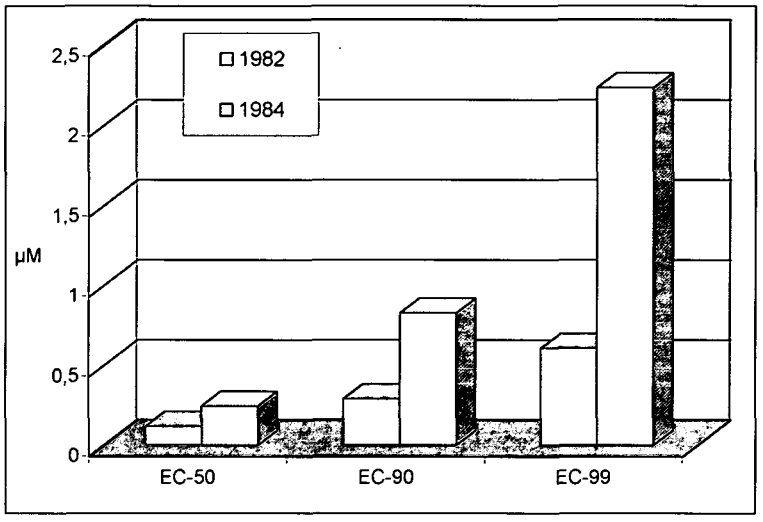

Abb. 3: Vergleich der EC_{50}, EC_{90} und EC_{99} Werte für Chinin bei *Plasmodium falciparum* in der Zentralregion von Thailand, 1982 und 1984.

Ausbreitung nennenswerter Resistenz in Afrika südlich der Sahara im Bezirk von Nord-Mara in Tanzanien bei Kindern unter 10 Jahren eine regelmäßige Malariaprophylaxe durchgeführt, um die Rolle der Falciparum-Malaria in der Entstehung von Burkitt's Lymphom zu klären. Das Gebiet ist als hyper- bis holo-endemisch eingestuft. Da die Parasitämieraten während der Beobachtungsperiode wieder angestiegen waren, wurden zunächst die Dosisintervalle verkürzt und schließlich auch die Einzeldosen heraufgesetzt. Auf diese Weise wurden die zunächst voll sensiblen *Plasmodium falciparum* Populationen innerhalb von 21/2 Jahren manifest resistent (Abb. 2) (DRAPER et al. 1985).

Der Einfluss inadäquater Therapie wurde in Thailand in den Jahren 1982-1984 deutlich, als wegen solider Resistenz gegenüber Chloroquin und Pyrimethamin/Sulfadoxin eine 7-tägige Kombinationsbehandlung mit Chinin und Tetrazyklin eingesetzt wurde. Zwar zeigte diese Kombination, lege artis und unter strikter klinischer Kontrolle angewandt, eine Heilungsrate von > 99 %, im ambulanten und poliklinischen Bereich lag die Heilungsrate jedoch nur bei 68 %, was teils auf mangelnde Beachtung der Therapieanweisung seitens der Patienten, teils auf einen verfrühten Abbruch der Medikation zurückzuführen war (SUEBSAENG et al. 1986). Sicherlich hat das Auftreten von Cinchonismus dabei eine Rolle gespielt, aber auch eine Überforderung der Patienten durch die Notwendigkeit im Laufe einer Woche 49 Medikamentendosen zeitgerecht einzunehmen. Das Fortbestehen eines ansehnlichen Parasitenreservoirs, welches die Exposition gegenüber Chinin überlebt hatte, führte zu einem signifikanten Absinken der Chininempfindlichkeit (Abb. 3).

Als Beispiel für den durch residuelle, post-therapeutische Blutspiegel eines Medikaments mit hoher Halbwertszeit ausgeübten Selektionsdruck kann die Entwicklung von Mefloquinresistenz im thailändisch/kambodschanischen Grenzgebiet in den Jahren 1988-1991 gelten (WERNSDORFER et al. 1994). In den thailändischen Malariakliniken wurde die Falciparum-Malaria mit Fansimef®, einem aus Mefloquin, Pyrimethamin und Sulfadoxin bestehenden Kombinationspräparat, behandelt. Die Mehrzahl der Patienten war in Kambodscha tätig und hatte sich dort die Malariainfektion zugezogen. Kurz nach der Behandlung kehrten die Patienten nach Kambodscha zurück und waren dort von neuem intensiver Malariaübertragung mit einer jährlichen Inokulationsrate von etwa 20-25 ausgesetzt. Ähnlicher Selektionsdruck entstand wenig später auf der burmesischen Seite des Grenzgebiets von Thailand und Myanmar. Dies erklärt die massive, bis an den Golf von Andaman reichende Mefloquinresistenz von *Plasmodium falciparum*, obgleich Mefloquin in Myanmar bisher nicht eingesetzt wurde.

Unter den humanpathogenen Malariaerregern zeigt *Plasmodium falciparum* offensichtlich das breiteste Spektrum von Arzneimittelresistenz. Dies ist ein Zeichen hoher Adaptationsfähigkeit, auf welche der nach Durchlaufen der kurzen prä-erythrozytären Entwicklungsphase ausschließlich im Blut befindliche Parasit angewiesen ist. *Plasmodium vivax* und *Plasmodium ovale* kommen ohne derartig hoch entwickelte physiologische Adaptationsfähigkeit aus, da ihr Überleben durch das Hypnozoitenreservoir gesichert ist und die erythrozytären Phasen ohnehin von relativ kurzer Dauer sind. Bei den asexuellen Blutformen von *Plasmodium vivax* ist bisher nur allgemeine Resistenz gegenüber Pyrimethamin und eine bisher auf den subäquatorialen Raum zwischen Indischem Ozean und Pazifik beschränkte Resistenz gegen Chloroquin bekannt geworden. Bei der Resistenz gegen Pyrimethamin könnte es sich um ein ohne Arzneimitteldruck, a priori bestehendes Phänomen handeln. *Plasmodium ovale* und *Plasmodium malariae* gelten weiterhin als chloroquinempfindlich. Bei *Plasmodium malariae* ist dies verwunderlich, da dieser Parasit über kein Hypnozoitenreservoir

© Biologiezentrum Linz/Austria; download unter www.biologiezentrum.at

verfügt und sich ähnlich wie *Plasmodium falciparum* nach Ablauf der prä-erythrozytären Phase ausschließlich auf das Blut beschränkt.

Molekularbiologische Gegebenheiten

Die Entwicklung geeigneter molekularbiologischer Methoden ermöglichte seit etwa einem Jahrzehnt die gezielte Suche nach genetischen, für die Arzneimittelresistenz bei *Plasmodium falciparum* verantwortlichen Polymorphismen. Die Suche nach derartigen Polymorphismen war erfolgreich bei mono- oder bifaktorieller Resistenz, wie sie z. B. gegen Pyrimethamin und Sulfonamiden besteht. Hingegen war sie bisher weniger ergiebig in der Aufklärung multifaktorieller Resistenz, z. B. gegen die 4-Aminochinoline und die Klasse 2 Arylaminoalkohole (WONGSRICHANALAI et al. 2002; WERNSDORFER & NOEDL 2003).

Resistenz gegen Pyrimethamin ist durch Polymorphismen am Gen für die Dihydrofolatreduktase (pfdhfr) charakterisiert, wobei Codon 108^{ASP} und Codon 164^{LEU} als führende Determinanten gelten und Codon 51^{ILE} sowie Codon 59^{ARG} zusätzliche Modulation für Pyrimethaminresistenz zugeschrieben wird (BASCO et al. 1998; URDANETA et al. 1999; NZILA et al. 2000). Resistenz gegen Proguanil wird anscheinend durch 16^{VAL} und 108^{THR} im pfdhfr Gen moduliert (KHAN et al. 1997; URDANETA et al. 1999; THAITHONG et al. 2001). Resistenz-assoziierte Polymorphismen im Dihydropteroatsynthetase-Gen (pfdhps) beziehen sich vor allem auf die Codons 436, 437, 540, 581 und 613, wobei die Konfigurationen 437^{GLY} und 581^{GLY} die stärkste Aussagekraft haben (URDANETA et al. 1999; NZILA et al. 2000; NAGESHA et al. 2001). Die 5-fache Kombination von 51^{ILE}, 59^{ARG} und 108^{ASP} in pfdhfr und 437^{GLY} und 540^{GLU} in pfdhps ist ein zuverlässiger Indikator von Resistenz gegen die Kombination von Pyrimethamin und Sulfonamiden (NZILA et al. 2000). Allerdings deuten jüngere Untersuchungen darauf hin, dass das gleichzeitige Auftreten von pfdhfr 59^{ARG} und pfdhps 540^{GLU} die Präsenz der 5-fachen Kombination verlässlich anzeigt (KUBLIN et al. 2002).

Untersuchungen des Chloroquin-Resistenztransporter Gens von *Plasmodium falciparum* (pfcrt) deuteten anfangs darauf hin, dass Polymorphismen in den Codons 72, 74, 75, 76 und 220 die Chloroquinresistenz ausreichend erklärten, doch fanden sich später zahlreiche Ungereimtheiten, welche auf die gleichzeitige Beteiligung anderer Gene hinwiesen (WERNSDORFER & NOEDL 2003). Eine Erklärung für die offensichtlichen Dichotomien wurde im „multi-drug resistance" Gen von *Plasmodium falciparum* (pfmdr1) gesucht, welches mit Polymorphismen in Codons 86, 184, 1034, 1042 und 1246 zunächst als Universal-Gen für Resistenz gegen 4-Aminochinoline und Klasse 2 Arylaminoalkohole sowie Artemisinin galt. Auch die Polymorphismen in pfmdr1 warfen mehr Fragen auf als sie lösten. Die Suche nach relevanten Polymorphismen in anderen Genen geht weiter, wobei im Gen für γ-Glutamylcysteinsynthetase mögliche Determinanten für Resistenz gegen Chloroquin und Mefloquin identifiziert wurden (PÉREZ-ROSADO et al. 2002). Einschlägige Untersuchungen weisen darauf hin, dass sich Resistenz gegen 4-Aminochinoline und Klasse 2 Arylaminoalkohole bei *Plasmodium falciparum* in einem breiten Spektrum von biochemischen und biophysikalischen Veränderungen äußern, welche die Beteiligung zahlreicher Gene nahelegen.

Prüfung der Arzneimittelempfindlichkeit

Als Definition derArzneimittelresistenz bei Malaria gilt die Fähigkeit eines Parasitenstammes trotz der Verabreichung und Absorption eines Medikaments in üblicher oder höherer, maximal tolerierter Dosierung zu überleben oder sich zu vermehren (WORLD HEALTH ORGANIZATION 1965). Dieser Definition folgend wurde schon 1964 ein in vivo Test zur Ermittlung der Chloroquinempfindlichkeit von *Plasmodium falciparum* entwikkelt (WORLD HEALTH ORGANIZATION 1965). Da die Ergebnisse von in vivo Tests durch die Immunitätslage der Patienten maßgeblich beeinflusst werden, geben sie keine Auskunft über die intrinsische Arzneimittelempfindlichkeit der Erreger. Diese kann nur durch in vitro Tests erfasst werden, welche seit 1968 zur Verfügung stehen.

In vivo Prüfverfahren

Das aus dem Jahre 1964 stammende in vivo Prüfverfahren für Chloroquin bei Infektionen mit *Plasmodium falciparum* wurde in der Folgezeit modifiziert und erhielt 1972 als „28 Tage Standardtest" seine auch heute noch gültige Fassung (WORLD HEALTH ORGANIZATION 1973). Einschlusskriterien für den Test sind Monoinfektionen mit *Plasmodium falciparum* bei einer asexuellen Parasitenzahl von 1000-100000 pro µl Blut. Ausschlusskriterien umfassen Zeichen von schwerer oder komplizierter Malaria, Behandlung mit Malariamitteln innerhalb der vorangegangenen 4 Wochen, Vorliegen anderweitiger Infektionskrankheiten, und Schwangerschaft. Es beruht auf der Verabreichung von Chloroquin gemäß dem international üblichen Dosisschema, d.h. 10 mg/kg Körpergewicht als erste Dosis, 6 Stunden später 5 mg/kg, gefolgt von 5 mg/kg 24 Stunden und 48 Stunden nach der ersten Dosis. Die auf Chloroquin-Base bezogene Gesamtdosis ist 25 mg/kg. Für den Test sollten ausschließlich Chloroquintabletten zuverlässiger Herkunft verwendet werden, deren Produktion laufender Qualitätskontrolle unterliegt. Vor dem Test und während der gesamten Testdauer von 28 Tagen werden täglich Blutproben (dicke Tropfen) abgenommen, nach Giemsa gefärbt und auf die Anwesenheit von asexuellen Malariaparasiten untersucht. In sämtlichen positiven dicken Tropfen wird auch die Parasitendichte bestimmt. In der Klassifikation der Resultate werden 4 Kategorien unterschieden: Sensibilität (S) und Resistenzgrade I, II und III:

© Biologiezentrum Linz/Austria; download unter www.biologiezentrum.at

- S = Abnahme der Parasitämie auf < 25 % des Ausgangswertes innerhalb von 48 Stunden nach Behandlungsbeginn. Endgültiges Verschwinden der asexuellen Parasiten spätestens am 6. Tag nach Behandlungsbeginn, ohne Wiederauftreten während der gesamten Beobachtungszeit von 28 Tagen.
- R-I = Anfängliches Ansprechen auf die Therapie wie bei S, Wiederauftreten von asexuellen Parasiten zwischen Tag 8 und Tag 28.
- R-II = Senkung der Parasitämie auf < 25 % des Ausgangswertes innerhalb von 48 Stunden nach Behandlungsbeginn, jedoch kein endgültiges Verschwinden der Parasitämie innerhalb der ersten Woche (Parasiten nachweisbar an Tag 6 und/oder Tag 7 nach Behandlungsbeginn.
- R-III = Innerhalb von 48 Stunden nach Behandlungsbeginn kein Rückgang der Parasitendichte auf < 25 % des Ausgangswertes.

Die zuverlässige Beurteilung des Prüfergebnisse setzt voraus, dass Neuinfektionen ausgeschlossen werden können. Hierzu können neuerdings PCR-Vergleiche zwischen den vor Behandlungsbeginn und am Tag des Wiederauftretens isolierten Parasitenpopulationen herangezogen werden. Als der 28 Tage Standardtest entwikkelt wurde existierte noch kein PCR-Verfahren. In Gegenden mit intensiver Malariaübertragung wurde daher ein 7-Tage-Test verwendet, bei welchem zwar keine Unterscheidung zwischen S und R-I, jedoch die Erkennung von R-II und R-III möglich war (WERNSDORFER & PAYNE 1988).

Die Methodik des Standardtests lässt sich auch für die Prüfung anderer Malariamittel einsetzen, wobei die Nachbeobachtungsdauer der Halbwertszeit des Medikaments anzupassen ist, z. B. 42 für Pyrimethamin/Sulfadoxin und 63 Tage für Mefloquin (WERNSDORFER & PAYNE 1988). Das Verfahren ist auch zur Sensibilitätsprüfung bei Mono-Infektionen mit *Plasmodium vivax* unter der Voraussetzung geeignet, dass die blutschizontozide Therapie mit Chloroquin wie üblich durch eine sofort anschließende hypnozoitozide Behandlung mit Primaquin ergänzt wird.

Die zahlreichen Schwierigkeiten bei der Durchführung der Standardtests, vor allem bei der Sicherung kontinuierlicher Nachbeobachtung haben diese Prüfverfahren aus dem Repertoire der Feldprüfungen weitgehend verschwinden lassen. Sie sind jedoch weiterhin ein wichtiger Bestandteil der klinischen Prüfung neuer Medikamente.

Die Notwendigkeit, regionale Behandlungsrichtlinien („drug policy") nach der Wirksamkeit der Medikamente auszurichten führte zur Entwicklung vereinfachter Testverfahren, deren Anwendung auch im ambulanten und poliklinischen Bereich möglich ist. Derartige vereinfachte Prüfverfahren wurden für die Anwendung in Gebieten mit intensiver Malariaübertragung und für die Durchführung in Gegenden mit geringer oder mäßiger Malariaübertragung ausgearbeitet (WORLD HEALTH ORGANIZATION 2002).

Der vereinfachte in vivo Test für Gebiete mit intensiver Malariaübertragung ist für eine Beobachtungsdauer von 14 Tagen ausgelegt und beinhaltet neben der parasitologischen Blutuntersuchung an den Tagen 0, 1, 2, 3, 7 und 14 auch die Beurteilung klinischer Kriterien, insbesondere der Körpertemperatur. Die Einbeziehung von Hämatokritbestimmungen an den Tagen 0 und 14 ist empfohlen, aber nicht Bedingung. In der Beurteilung der Ergebnisse werden frühes Therapieversagen (ETF), spätes Therapieversagen (LTF), spätes parasitologisches Versagen (LPF) und adäquates klinisches und parasitologisches Ansprechen (ACPR) mit folgenden Definitionen unterschieden:

- ETF = Auftreten von Gefahrenzeichen oder schwerer Malaria an den Tagen 1, 2 oder 3 bei manifester asexueller Parasitämie; asexuelle Parasitämie an Tag 2 höher als an Tag 0, unabhängig von der Körpertemperatur; asexuelle Parasitämie an Tag 3 ≥ 25 % des Wertes von Tag 0; asexuelle Parasitämie an Tag 3 bei erhöhter axillärer Körpertemperatur (≥ 37,5°C).
- LTF = Auftreten von Gefahrenzeichen oder schwerer Malaria zwischen Tag 4 und Tag 14 bei manifester asexueller Parasitämie, ohne vorher die Kriterien für ETF erfüllt zu haben; manifeste asexuelle Parasitämie gleichzeitig mit axillärer Körpertemperatur ≥ 37,5°C zwischen Tag 4 und Tag 14.
- LPF = Bestehen asexueller Parasitämie an Tag 14 bei axillärer Körpertemperatur < 37,5°C, ohne vorher die Kriterien für ETF oder LTF erfüllt zu haben.
- ACPR = Fehlen asexueller Parasitämie an Tag 14, unabhängig von der Körpertemperatur, ohne bis dahin die Kriterien von ETF und LTF erfüllt zu haben.

Bei dem vereinfachten Test für Gebiete mit geringgradiger oder mäßiger Malariaübertragung erstreckt sich die Nachbeobachtungsdauer auf 28 Tage. Parasitologische und klinische Untersuchungen werden routinemäßig an den Tagen 0, 1, 2, 3, 7, 14, 21 und 28 durchgeführt. Untersuchungen sind auch an anderen Tagen vorzunehmen, wenn der Zustand des Patienten auf klinische Verschlechterung hinweist. Auch hier erfolgt die Beurteilung des Behandlungsergebnisses gemäß ETF, LTF, LPF und ACPR, wobei die Definition des frühen Therapieversagens jener des Tests für Gebiete mit intensiver Malariaübertragung entspricht. Für die Kategorien LTF, LPF und ACPR trifft gleiches zu mit der Modifikation, dass die Anwendung der Kriterien auf die gesamte Beobachtungsdauer von 28 Tagen ausgedehnt wird.

Im allgemeinen gilt, dass ein Wechsel der Routinemedikation („first line treatment") angezeigt ist, sobald

© Biologiezentrum Linz/Austria; download unter www.biologiezentrum.at

Häufigkeit frühen oder späten Therapieversagens 25 % erreicht hat (WORLD HEALTH ORGANIZATION 2001). In Gebieten mit intensiver Malariaübertragung kann sich dies auf Personen mit unzureichender Immunität, z. B. Kinder unter 5 Jahren beschränken.

Bei der Durchführung von in vivo Prüfungen ist die laufende Überwachung der Patienten sicherzustellen, um rechtzeitig Gefahrenzeichen erfassen und die Kranken wirksamer alternativer Behandlung zuführen zu können. Prüfungen ohne ausreichende Sicherheit für die Patienten sind aus ethischen Gründen abzulehnen.

In vitro Prüfverfahren für periphere Laboratorien

Plasmodium falciparum

Schon vor nahezu 100 Jahren gelang in frischen Isolaten von *Plasmodium falciparum* und *Plasmodium vivax* die Weiterzüchtung bis zur Vollendung der Schizontenreifung (BASS & JONES 1912). Darauf aufbauend entwickelten RIECKMANN et al. (1968) ein in vitro Testsystem für die Messung der Arzneimittelempfindlichkeit bei *Plasmodium falciparum*. Hierzu wurde parasitenhaltiges defibriniertes Blut mit Glukosezusatz und ansteigenden Medikamentkonzentrationen für 24 Stunden in verschlossenen sterilen Röhrchen bei 37,5°C gehalten. Nach der Inkubation wurden dicke Tropfen aus dem Sediment der Röhrchen angelegt. In den Giemsa-gefärbten Präparaten von medikamentfreier Kontrolle und medikamenthaltigen Proben wurde die Schizontenzahl gegen jeweils 200 asexuelle Parasiten ausgezählt. Auf der Basis der Kontrollwerte wurde die medikamentbedingte Hemmung der Schizontenreifung bestimmt. Dieses Verfahren, wegen der Notwendigkeit der Entnahme von jeweils 10-12 ml venösen Blutes auch „Makromethode" genannt, ist weitgehend in Vergessenheit geraten, da seit mehr als zwei Jahrzehnten eine sehr viel bequemer anwendbare und zuverlässigere „Mikromethode" existiert.

Grundlage für die Entwicklung der Mikromethode war die erfolgreiche Dauerkultur von *Plasmodium falciparum* (TRAGER & JENSEN 1976), wobei dem hierfür verwendeten Kulturmedium und der Gasmischung in den Kulturgefäßen besondere Bedeutung zukam. Die erste Mikromethode für Sensibilitätsstudien bei *Plasmodium falciparum* wurde mit Blut von *Aotus trivirgatus* durchgeführt (RIECKMANN et al. 1978). Diese Methode wurde für die Verwendung frischer Parasitenisolate von *Plasmodium falciparum* adaptiert und schließlich als Standardtest eingeführt (WERNSDORFER 1980).

Der Mikrotest zur Messung der Arzneimittelempfindlichkeit von *Plasmodium falciparum* basiert auf der Bestimmung der medikamentbedingten Schizontenreifungshemmung. Zur Durchführung des Tests werden aus der desinfizierten Fingerbeere 100 µl Blut mittels heparinisierter Kapillare entnommen und in 900 µl RPMI-1640 Medium ohne Serumzusatz suspendiert. Aliquots von 50 µl der Blut-Medium-Mischung (BMM) werden in die Vertiefungen der Testreihe auf der vordosierten 8 x 12 Mikrotiterplatte eingebracht. Die beimpfte Mikrotiterplatte wird mit einem sterilen Deckel verschlossen und in das Inkubationsgefäß (Kerzentopf oder Kerzenbehälter) verbracht. Nach Schließen des Inkubationsgefäßes und Verlöschen der Kerze wird das Gefäß in den Inkubator verbracht und für etwa 24-25 Stunden bei 37,5°C gehalten. Im Inkubationsgefäß herrscht eine Atmosphäre von etwa 5 % CO_2, 16 % O_2, 78 % N_2 und 1 % Edelgasen, was der Gasspannung im menschlichen Kapillarbereich entspricht. Nach der Inkubation werden die Testplatten entnommen und die Sedimente der Testreihe nach Entfernung der überstehenden Medium-Plasma-Mischung in feststehender Reihenfolge als dicke Tropfen auf einen Objektträger aufgebracht. Nach vollständiger Trocknung werden die Präparate nach Giemsa bei pH 6,85 gefärbt. Die Auszählung erfolgt wiederum nach der Zahl von Schizonten pro 200 asexuelle Formen. Vertiefung A der vordosierten Testplatten ist die medikamentfreie Kontrolle. Vertiefungen B-H enthalten das Medikament in ansteigenden Konzentrationen, z. B. für Chinin entsprechend Konzentrationen von 80-5120 nM, für Lumefantrin von 3-3000 nM. Tests mit einer Mindestzahl von 20 Schizonten / 200 asexuelle Parasiten in der medikamentfreien Kontrolle werden als gültig gewertet.

Die grobe Auswertung der individuellen Testreihen erfolgt gemäß der geringsten Wirkstoffkonzentration, bei welcher eine vollständige Hemmung der Schizontenreifung festgestellt wurde („cut-off concentration"). Bei der Gruppenauswertung wird der geometrische Mittelwert für vollständige Hemmung errechnet. Dieser Mittelwert und sein Vertrauensbereich (95 %) geben ersten Aufschluss über Sensibilität und den Grad interindividueller Variation. Da die konzentrationsbedingte Hemmung der Schizontenreifung bei *Plasmodium falciparum* bei den meisten Medikamenten ein log-normales Muster aufweist, erfolgt die eingehendere Analyse der Testdaten nach der Log-Probit Methode von LITCHFIELD & WILCOXON (1949). Diese erlaubt die Errechnung der EC-Werte, z. B. EC_{50}, EC_{90} und EC_{99} der individuellen Testreihen. Für die Analyse der gruppierten Testergebnisse steht eine EDV-Version der Log-Probit Methode zur Verfügung (WERNSDORFER & WERNSDORFER 1995). Neben den wichtigsten EC-Werten und deren 95 % Vertrauensbereiche gibt die EDV-Auswertung auch Aufschluss über zahlreiche andere Parameter, wie Korrelationskoeffizient, Heterogenität, Steigung der Log-Probit Regression. Die gewonnene Regressionslinie, deren 95 % Vertrauensbereiche und die beobachteten mittleren Hemmwerte bei den geprüften Konzentrationen eignen sich für graphische Darstellung (Abb. 4-6).

Während die oben erwähnten Methoden für die Sensibilitätsprüfung auf der Auswertung morphologi-

© Biologiezentrum Linz/Austria; download unter www.biologiezentrum.at

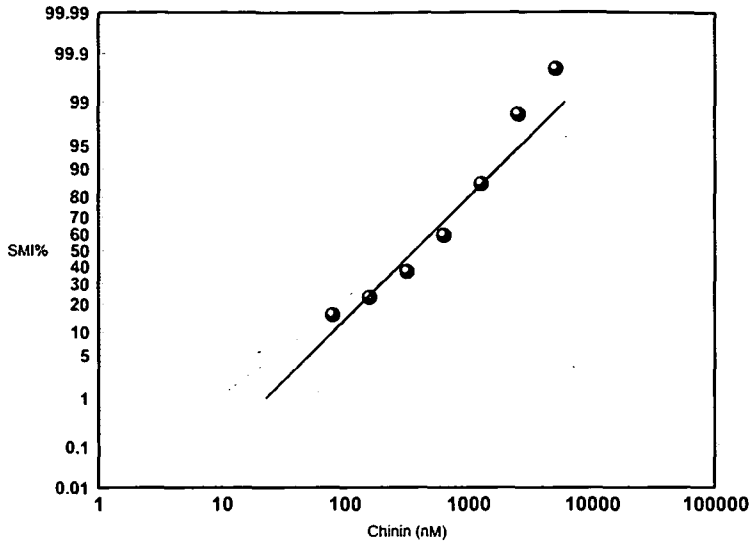

Abb. 4: Log-Probit Regression für Chinin bei *Plasmodium falciparum* in Mae Sot, Thailand, 1955, mit Vertrauensbereich der Regressionslinie (95 %) und beobachteten Datenpunkten (SMI% = % Hemmung der Schizontenreifung).

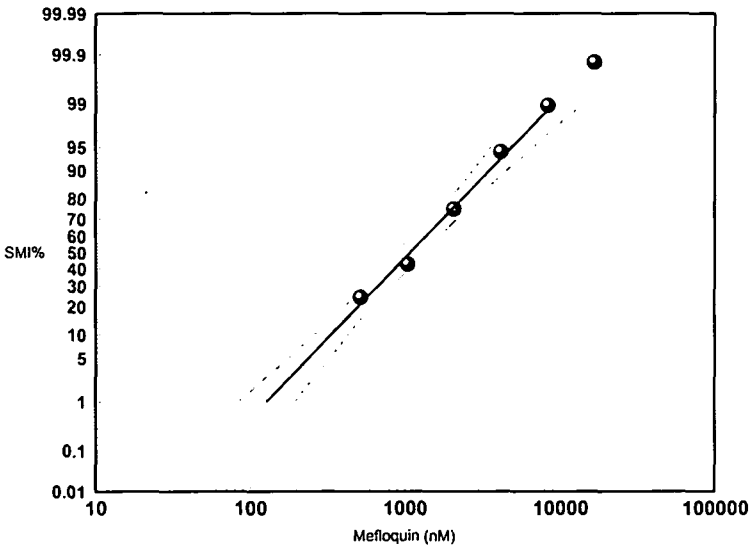

Abb. 5: Log-Probit Regresion für Mefloquin bei *Plasmodium falciparum* in Mae Sot, Thailand, 2002, mit Vertrauensbereich der Regressionslinie (95 %) und beobachteten Datenpunkten (SMI% = % Hemmung der Schizontenreifung).

scher Kriterien beruhen, stützt sich eine jüngst entwickelte Methodik für *Plasmodium falciparum* auf die Messung der metabolisch produzierten Mengen von Histidin-reichem Protein II und die medikamentbedingte Hemmung der Produktion dieses Proteins (NOEDL et al. 2002). Dieses teilweise automatisierte ELISA Verfahren ist zwar technisch aufwendiger als der morphologische Mikrotest, jedoch sind die Ergebnisse durch die Verwendung eines ELISA Lesegeräts zuverlässiger. In Ländern mit hohem Lohnniveau werden die höheren Kosten für Apparatur und Reagentien durch die Arbeitszeitersparnis ausgeglichen. Hingegen ist der morphologische Mikrotest in Ländern mit geringeren Arbeitskosten bisher ökonomischer.

In vitro Test für *Plasmodium vivax*

Trotz erheblichen Aufwands ist es bisher nicht gelungen, *Plasmodium vivax* in Dauerkultur zu etablieren. Dennoch wurden insbesondere durch die Wahl geeigneter Nährmedien Fortschritte in der Kurzzeitkultur von *Plasmodium vivax* erzielt (BROCKELMAN et al. 1989). Erst in den Jahren 2000-2002 wurde eine geeignete, reproduzierbare in vitro Testmethode für *Plasmodium vivax* entwickelt (TASANOR et al. 2002), welche auch im Vergleich mit parallelen in vivo Tests validiert wurde (CONGPUONG et al. 2002). Dieses Testsystem entspricht in der Durchführung dem Mikrotest für *Plasmodium falciparum*, jedoch wird eine höhere Blutverdünnung (1:20) verwendet. Als Medium hat sich eine 1:1 Mischung von RPMI-1640 und Waymouth-Medium am besten bewährt. Für den Test werden vordosierte Mikrotiterplatten verwendet. Die Inkubation erfolgt im Kerzengefäß bei 37,5°C für eine Dauer von 30 Stunden. Die Entnahme der Sedimente aus den Platten und die Anfertigung der dicken Tropfen (1 komplette Testserie pro Objektträger) erfolgt analog dem Test für *Plasmodium falciparum*. Die Giemsa-Färbung erfolgt jedoch bei pH 7,0. Da bei *Plasmodium vivax* im peripheren Blut gewöhnlich asexuelle Formen verschiedener Altersstufen vorkommen, kann sich die Auswertung nicht auf die Auszählung der Schizonten stützen. Hingegen gibt die Auswertung nach den Prinzipien der Wachstumshemmungstests zuverlässige Resultate. Zu diesem Zweck werden stadienspezifische Differentialzählungen durchgeführt, wobei junge Trophozoiten, mittlere + fortgeschrittene Trophozoiten, Präschizonten mit < 8 Chromatinkörpern und Schizonten mit ≥ 8 Chromatinkörpern unterschieden werden. In die Testung werden nur Parasitenisolate mit ausreichendem, in der Präinkubationskontrolle ersichtlichem Wachstumspotential und geringem Schizontenanteil aufgenommen. Dies sind erfahrungsgemäß > 80 % aller natürlichen Parasitenpopulationen. Die Auswertung der individuellen Tests erfolgt gemäß einem stadienspezifischen Punktesystem (TASANOR et al. 2002). Für die Auswertung der gruppierten Tests können die Werte direkt in das EDV-adaptierte Log-Probit System (WERNSDORFER & WERNSDORFER 1995) übertragen werden. Auch hier eignen sich die Regressionslinien, deren 95 % Vertrauensgrenzen und die mittleren Datenpunkte zur graphischen Darstellung (Abb. 7 & 8).

Anwendungsgebiet von in vitro Prüfverfahren

Im Unterschied zu in vivo Prüfverfahren geben die Resultate von in vitro Tests Auskunft über die intrinsische Arzneimittelempfindlichkeit der asexuellen erythrozytären Parasiten. Sie weisen meist auch eine geringere Ausfallquote auf. In Gebieten mit geringer kommunaler Immunität, d.h. geringgradiger oder mäßiger Malariaübertragung entsprechen die Ergebnisse der in vitro

© Biologiezentrum Linz/Austria; download unter www.biologiezentrum.at

Tests jenen der in vivo Prüfungen, unabhängig vom Alter der Patienten.

Die Anwendungsmöglichkeiten der in vitro Testverfahren ist vielfältig. Im Zusammenhang mit der Überwachung der Arzneimittelempfindlichkeit von *Plasmodium falciparum* und neuerdings von *Plasmodium vivax* werden in vitro Tests in der Erfassung von Basisdaten für Medikamente vor deren breiterer Anwendung im Untersuchungsgebiet eingesetzt, wie dies in Abb. 9 am Beispiel von Artemisinin bei *Plasmodium falciparum* gezeigt ist. Sie eignen sich auch für präzise longitudinale Untersuchungen über längere Zeiträume. Abb. 10 gibt Aufschluss über die Entwicklung der Mefloquinempfindlichkeit von *Plasmodium falciparum* in der westlichen Region Thailands zwischen den Jahren 1982 und 2001. Der Rükkgang der Sensibilität zwischen 1982 und 1984, also noch vor der Einführung von Mefloquin, ist als Kollateralerscheinung zur gleichzeitigen und ausgeprägteren Abnahme der Chininempfindlichkeit zu verstehen (SUEBSAENG et al. 1986), da zwischen Chinin und Mefloquin (beides 4-Chinolinmethanole) eine signifikante Wirkungskorrelation besteht. Ferner lassen die Ergebnisse von in vitro Untersuchungen Sensibilitätsvergleiche zwischen verschiedenen Gebieten zu, soweit die Beobachtungen zeitlich nahe beieinander liegen. Dies ist in Abb. 11 am Beispiel der Lumefantrinempfindlichkeit von *Plasmodium falciparum* in Tansania und Thailand 1993/1994 gezeigt. Zu dieser Zeit wurde Lumefantrin noch in keinem der beiden Länder verwendet. Die geringere, dennoch voll im therapeutischen Bereich liegende Sensibilität in Thailand dürfte auf die dort bestehende herabgesetzte Empfindlichkeit gegenüber anderen Klasse 2 Arylaminoalkoholen zurückzuführen sein. Ähnlich zeigen sich im geographischen Vergleich der Artemisininempfindlichkeit von *Plasmodium falciparum* zwischen Tansania, Thailand und China (1993/1994) erhebliche Unterschiede (Abb. 12). Die im Vergleich zu Tansania flacheren Regressionen in Thailand weisen bereits auf ein anscheinend durch die freie Verfügbarkeit von Artemisininderivaten im benachbarten Myanmar gesteuertes Selektionsphänomen hin. Die gegenüber den thailändischen Sensibilitätswerten um etwa eine Größenordnung geringere Artemisininempfindlichkeit in China dürfte dem liberalen Einsatz von Artemisininderivaten in Monotherapie zuzuschreiben sein. Artemisinin und seine Derivate allein sind in der üblichen Dosierung selten kurativ und hinterlassen ein selektiertes Parasitenreservoir.

Neben diesen epidemiologischen Anwendungen, können in vitro Prüfverfahren auch erfolgreich in der Forschung eingesetzt werden. So wurde in einer Vergleichsstudie bei *Plasmodium falciparum* die relative Wirksamkeit der 4 *Cinchona*-Hauptalkaloide (Chinin, Chinidin, Cinchonin und Cinchonidin) endgültig geklärt (KNAUER et al. 2003). Während sich diese Studie auf zwei Diastereomerpaare bezog, wurde in einer anderen Untersuchung die Wirksamkeit der Lumefantrin-Enantiomere (⁻Lumefantrin und ⁺Lumefantrin) verglichen (WERNSDORFER et al. 1998). Nicht zuletzt kommt den in vitro Testverfahren Bedeutung in der Untersuchung der Wirksamkeit neuer Kandidatenverbindungen zu, wobei die Feldprüfungen an zahlreichen Parasitenisolaten den auf wenige Stämme beschränkten Beobachtungen in kontinuierlicher Kultur an Aussagekraft weit überlegen sind. Abb. 13 zeigt eine derartige Anwendung am Beispiel von Desbutyl-Benflumetol, einem Lumefantrinanalog, bei *Plasmodium vivax*. Ferner werden in vitro Testverfahren in der Klärung von Wirkungskorrelationen zwischen verschiedenen Medika-

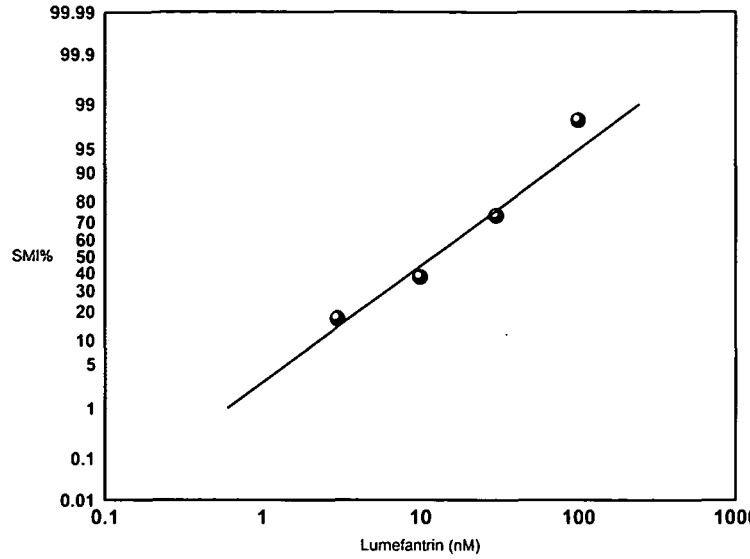

Abb. 6: Log-Probit Regression für Lumefantrin bei *Plasmodium falciparum* in Mae Sot, Thailand, 1988, mit Vertrauensbereich der Regressionslinie (95 %) und beobachteten Datenpunkten (SMI % = % Hemmung der Schizontenreifung).

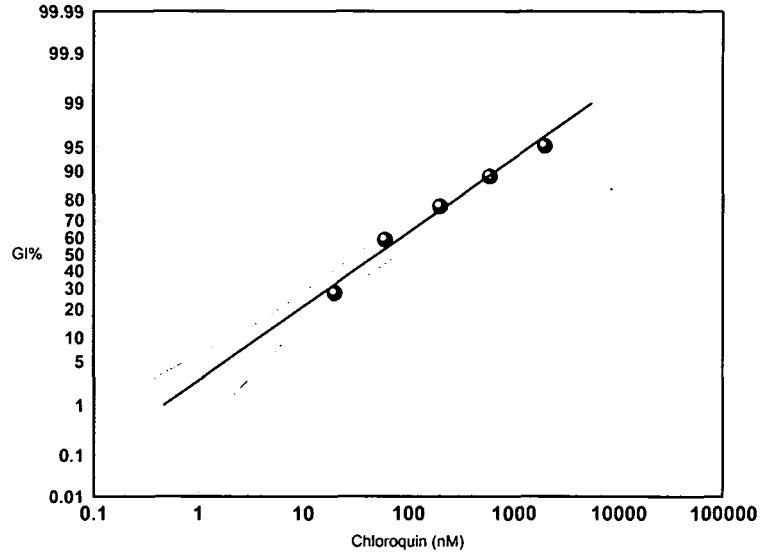

Abb. 7: Log-Probit Regression für Chloroquin bei *Plasmodium vivax* in Mae Sot, Thailand, 2001, mit Vertrauensbereich der Regressionslinie (95 %) und beobachteten Datenpunkten (GI% = % Wachstumshemmung).

© Biologiezentrum Linz/Austria; download unter www.biologiezentrum.at

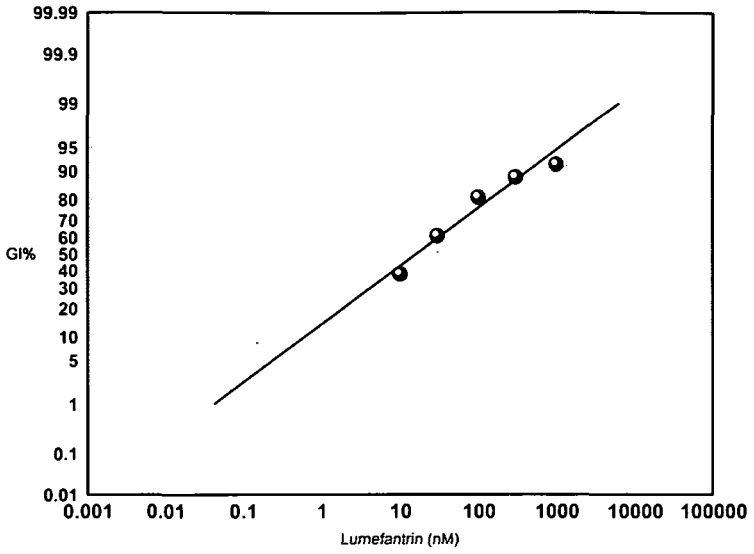

Abb. 8: Log-Probit Regression („baseline") für Lumefantrin bei *Plasmodium vivax* in Mae Sot, Thailand, 2001, mit Vertrauensbereich der Regressionslinie (95 %) und beobachteten Datenpunkten (GI% = % Wachstumshemmung).

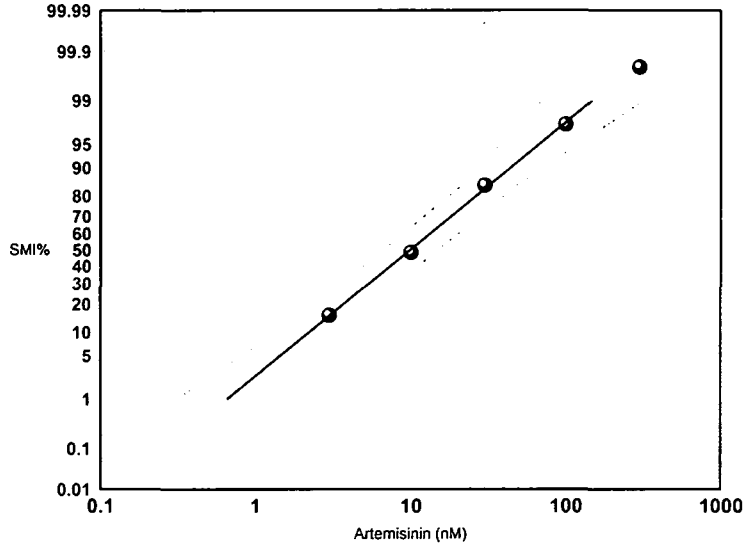

Abb. 9: Log-Probit Regression („baseline") für Artemisinin bei *Plasmodium falciparum* in Mae Sot, Thailand, 1995, mit Vertrauensbereich der Regressionslinie (95 %) und beobachteten Datenpunkten (SMI% = % Hemmung der Schizontenreifung).

menten und in der quantitativen Erfassung von pharmakodynamischen Arzneimittelinteraktionen eingesetzt.

Ausblick

Während sich die Chloroquinresistenz bei *Plasmodium vivax* derzeit of das subäquatoriale Inselgebiet zwischen Indischem Ozean und Pazifik beschränkt, erstreckt

sich die Chloroquinresistenz von *Plasmodium falciparum* auf das gesamte Verbreitungsgebiet dieser Spezies, mit Ausnahme Mittel- und Nordamerikas. Solide Resistenz gegen Kombinationen von Pyrimethamin und Sulfonamiden ist in Südamerika und Hinterindien etabliert. In Hinterindien sind Thailand, Myanmar, Kambodscha und Vietnam von Multiresistenz, d.h. Resistenz gegen mindestens drei, verschiedenen chemischen Klassen zugehörige Medikamente betroffen. Im übrigen südasiatischen Raum und im tropischen Afrika hat Resistenz gegen Antifolate innerhalb der jüngst vergangenen Jahre rasch an Terrain gewonnen und es ist lediglich eine Frage der Zeit, bis Frequenz und Grad der Resistenz auch in diesen Gebieten die weitere Verwendung dieser Medikamente ausschließen. Die liberale Anwendung der relativ billigen Arzneimittel hat viel zu dieser Entwicklung beigetragen. Weitere therapeutische Optionen sind beschränkt und teuer. Daher wird es notwendig sein, in allen Endemiegebieten – soweit dies noch nicht geschehen ist – den Grundsätzen der rationalen Therapie zu folgen. Dazu gehören Therapie auf der Basis einwandfreier Diagnose, die post-therapeutische Beobachtung der Patienten, die regelmäßige Überwachung der Parasitensensibilität und nicht zuletzt die Erarbeitung, laufende Aktualisierung und Beachtung von Behandlungsrichtlinien.

Literatur

Basco L.K., Tahar R. & P. Ringwald (1998): Molecular basis of in vivo resistance to sulfadoxine-pyrimethamine in African adult patients infected with *Plasmodium falciparum* malaria parasites. — Antimicrob. Agents Chemother. **42**: 1811-1814.

Bass C.C. & F.M. Johns (1912): The cultivation of malaria plasmodia (*Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum*). — J. Exp. Med. **16**: 567-579.

Beale G.H. (1980): The genetics of drug resistance in malaria parasites. — Bull. WHO **58**: 799-804.

Brockelman C.R., Tan-Arya P. & D. Bunnag (1989): Development of an in vitro micro test for the assessment of *Plasmodium vivax* sensitivity to chloroquine. — Southeat Asian J. Trop. Med. Publ. Hlth **20**: 41-47.

China Cooperative Research Group on Qinghaosu and its Derivatives as Antimalarials (1982): Chemical studies on Qinghaosu (artemisinine). — J. Tradit. Chin. Med. **2**: 3-8.

Congpuong K., Na-Bangchang K., Thimasarn K., Tasanor U. & W.H. Wernsdorfer (2002): Sensitivity of *Plasmodium vivax* to chloroquine in Sa Kaeo Province, Thailand. — Acta Tropica **83**: 117-121.

Draper C.C., Brubaker G., Geser A., Kilimali V.A.E.B. & W.H. Wernsdorfer (1985): Serial studies on the evolution of chloroquine resistance in an area of East Africa receiving intermittent malaria chemosuppression. — Bull. WHO **63**: 109-118.

Giemsa G. & H. Werner (1914): Erfahrungen mit weiteren, dem Chinin nahestehenden Alkaloiden und einigen ihrer Derivate bei Malaria. — Archiv für Schiffs- und Tropenhygiene **18**: Beiheft 5.

Harinasuta T., Migasen S. & D. Boonag (1962): Chloroquine resistance in Thailand. — In: UNESCO 1st Regional Symposium on Scientific Knowledge of Tropical Parasites, 5-9 November 1962. University of Singapore: 143-153.

Jaretzky R. & J. Geith (1944): Die deutschen Heilpflanzen in Bild und Wort. — Deutscher Schulbuchverlag, Berlin, Bd **2**: 301.

Khan B., Omar S., Kanyara J.N. et al. (1997): Antifolate drug resistance and point mutations in *Plasmodium falciparum* in Kenya. — Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. **91**: 456-460.

© Biologiezentrum Linz/Austria; download unter www.biologiezentrum.at

KNAUER A., SIRICHAISINTHOP J., REINTHALER F.F., WIEDERMANN G., WERNSDORFER G. & W.H. WERNSDORFER (2003): In-vitro response of *Plasmodium falciparum* to the main alkaloids of *Cinchona* in northwestern Thailand. — Wien. Klin. Wschr **115** (Suppl. 3): 39-44.

LAVERAN A. (1880): Note sur un nouveau parasite trouvé dans le sangue de plusieurs malades atteints de fièvre palustre. — Bull. Acad. Méd., 2ième série **9**: 1235-1236.

LITCHFIELD J.T. & F. WILCOXON (1949): A simplified method of evaluating dose-effect experiments. — J. Pharmacol. Exp. Med. **96**: 99-113.

MABERTI S. (1960): Desarollo de resistencia a la pirimetamina. Presentacion de 15 casos estudiados en Trujillo, Venezuela. — Arch. Venez. Med. Trop. Parasit. Med. **3**: 239-259.

MADRAS CINCHONA COMMISSION (1870): Return East India (Cinchona cultivation). — H.M. Stationery Office, London.

MEUWISSEN J.H.E.T. (1961): Resistance of *Plasmodium falciparum* to pyrimethamine and proguanil in Netherlands New Guinea. — Am. J. Trop. Med. Hyg. **10**: 135-139.

MOORE D.V. & J.E. LANIER (1961): Observations on two *Plasmodium falciparum* infections with abnormal response to chloroquine. — Am. J. Trop. Med. Hyg. **10**: 5-9.

NAGESHA H.S., DIN-SYAFRUDDIN, CASEY G.J. et al. (2001): Mutations in the pfmdr1, dhfr and dhps genes of *Plasmodium falciparum* are associated with in-vivo drug resistance in West Papua, Indonesia. — Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. **95**: 43-49.

NEIVA A. (1910): Über die Bildung einer chininresistenten Rasse des Malariaparasiten. — Memor. Instit. Oswaldo Cruz **2**: 131-140.

NOCHT B. & H. WERNER (1910): Beobachtungen über relative Chininresistenz bei Malaria aus Brasilien. — Deutsch. Med. Wschr **36**: 1557-1560.

NOEDL H., WERNSDORFER W.H., MILLER R.S. & C. WONGSRICHANALAI (2002): Histidine-rich protein II: a novel approach to malaria drug sensitivity testing. — Antimicrob. Agents Chemoth. **46**: 1658-1664.

NZILA A.M., MBERU E.K., SULO J. et al. (2000): Towards an understanding of the mechanism of pyrimethamine-sulfadoxine resistance in *Plasmodium falciparum*: genotyping of dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase of Kenyan parasites. — Antimicrob. Agents Chemoth. **44**: 991-996.

PAYNE D. (1988): Did medicated salt hasten the spread of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*? — Parasitol. Today **4**: 112-115.

PÉREZ-ROSADO J., GERVAIS G.W., FERRER-RODRÍGUEZ I. et al. (2002): *Plasmodium berghei*: analysis of the γ-glutamylcysteine synthetase gene in drug-resistant lines. — Exp. Parasitol. **101**: 175-182.

RIECKMANN K.H., MCNAMARA J.V., FRISCHER H., STOCKERT T.A., CARSON P.E. & R.D. POWELL (1968): Effects of chloroquine, quinine and cycloguanil upon the maturation of asexual erythrocytic forms of two strains of *Plasmodium falciparum* in vitro. — Am. J. Trop. Med. Hyg. **17**: 661-671.

RIECKMANN K.H., CAMPBELL G.H., SAX L.J. & J.E. MREMA (1978): Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*. — An in vitro micro technique. — Lancet **1**: 22-23.

SUCHARIT S., SURATHIN K., TUMRASRIN W. & P. SUCHARIT (1977): Chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* in Thailand: Susceptibility of *Anopheles*. — J. Med. Assoc. Thailand **60**: 648-654.

SUEBSAENG L., WERNSDORFER W.H. & W. ROONEY (1986): Sensitivity to quinine and mefloquine of *Plasmodium falciparum* in Thailand. — Bull. WHO **64**: 759-765.

TASANOR O., NOEDL H., NA-BANGCHANG K., CONGPUONG K., SIRICHAISINTHOP J. & W.H. WERNSDORFER (2002): An in vitro system for assessing the sensitivity of *Plasmodium vivax* to chloroquine. — Acta Tropica **83**: 49-61.

THAITHONG S., RANFORD-CARTWRIGHT I., SIRIPOON et al. (2001) *Plasmodium falciparum:* gene mutations and amplification of dihydrofolate reductase genes in parasites grown in vitro in presence of pyrimethamine. — Exp. Parasitol. **98**: 59-70.

TRAGER W. & J.B. JENSEN (1976): Human malaria parasites in continuous culture. — Science **193**: 673-675.

URDANETA L., PLOWE C., GOLDMAN I. & A.A. LAL (1999): Point mutations in dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase genes of *Plasmodium falciparum* isolates from Venezuela. — Am. J. Trop. Med. Hyg. **61**: 457-462.

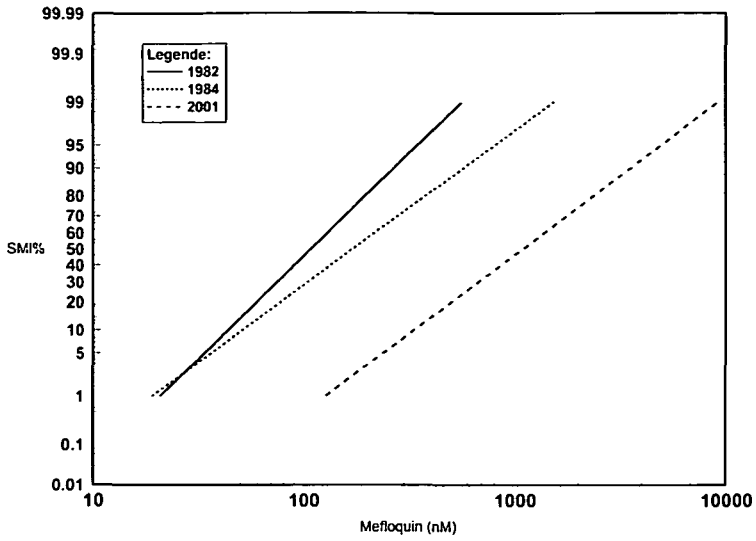

Abb. 10: Longitudinale Beobachtung der Mefloquinempfindlichkeit von *Plasmodium falciparum* im Westen Thailands, 1982-2001. Log-Probit Regressionen (SMI % = % Hemmung der Schizontenreifung).

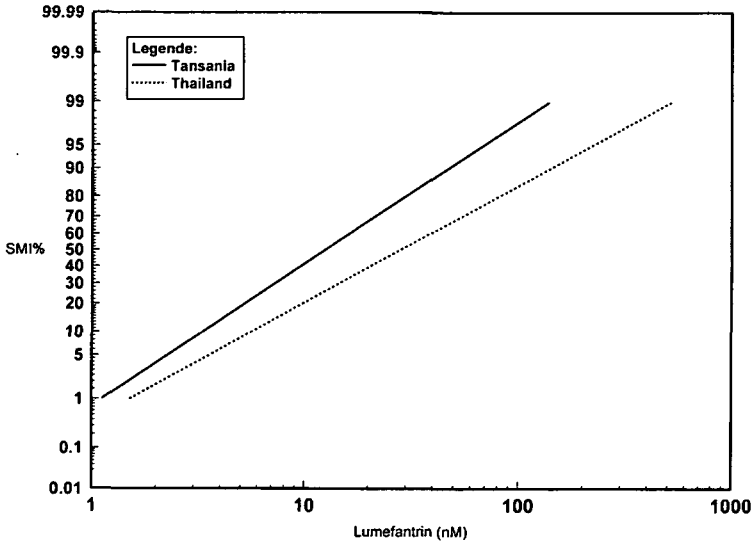

Abb. 11: Vergleich der Lumefantrinempfindlichkeit von *Plasmodium falciparum* in Muheza, Tansania, und Mae Hong Son, Thailand, 1993/1994. Log-Probit Regressionen (SMI% = % Hemmung der Schizontenreifung).

© Biologiezentrum Linz/Austria; download unter www.biologiezentrum.at

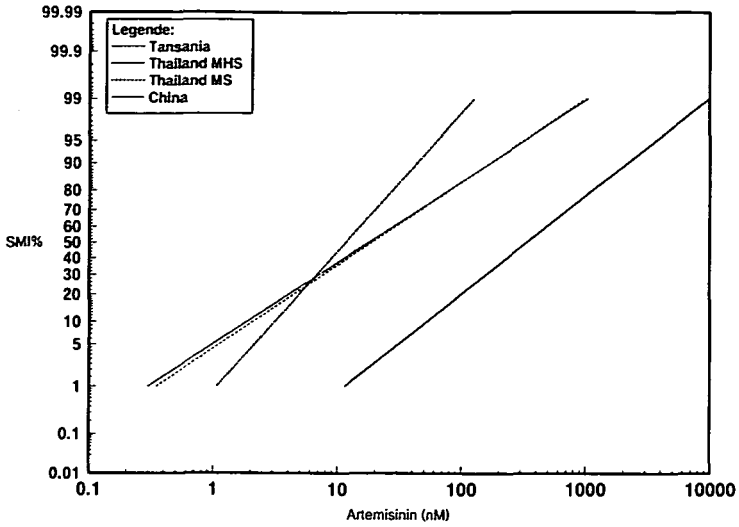

Abb. 12: Vergleich der Artemisininempfindlichkeit von *Plasmodium falciparum* in Muheza, Tansania, Mae Sot (MS) und Mae Hong Son (MHS), Thailand, und Yunnan, China, 1993/1994. Log-Probit Regressionen (SMI% = % Hemmung der Schizontenreifung).

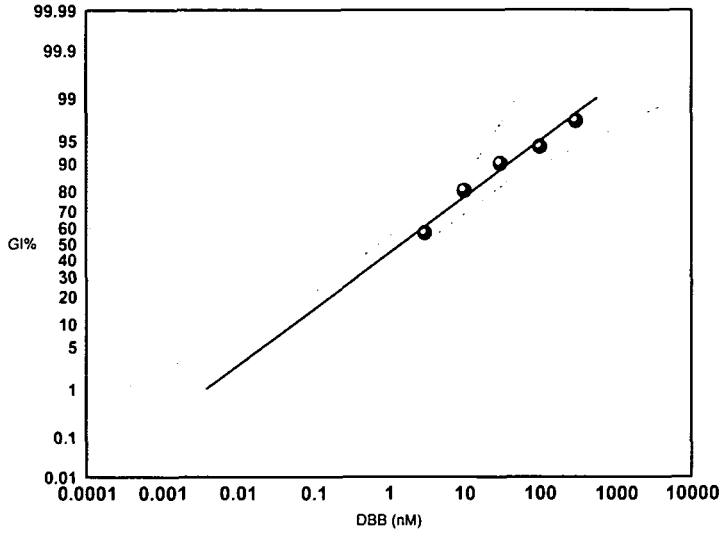

Abb. 13: Empfindlichkeit von *Plasmodium vivax* gegenüber Desbutyl-Benflumetol, einem Analog von Lumefantrin. Untersuchungen in Mae Sot, Thailand, 2001. Log-Probit Regression mit 95 % Vertrauensbereich und beobachteten Datenpunkten (GI% = % Wachstumshemmung).

WERNSDORFER G. & W.H. WERNSDORFER (1991): Malariamittel aus Pflanzen. — Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. **13**: 287-300.

WERNSDORFER W.H. (1980): Field evaluation of drug resistance in malaria. In vitro microtest. — Acta Tropica **37**: 222-227.

WERNSDORFER W.H. (1994): Epidemiology of drug resistance in malaria. — Acta Tropica **56**: 143-156.

WERNSDORFER W.H. & H. NOEDL (2003): Molecular markers for drug resistance in malaria: use in treatment, diagnosis and epidemiology. — Curr. Opin. Infect. Dis. **16**: 553-558.

WERNSDORFER W.H. & D. PAYNE (1988): Drug sensitivity tests in malaria parasites. In: WERNSDORFER W.H. & I.A. MCGREGOR (Eds) Malaria: Principles and practice of malariology. — Churchill Livingstone, Edinburgh: 1765-1800.

WERNSDORFER W.H. & M.G. WERNSDORFER (1995): The evaluation of in vitro tests for the assessment of drug response in *Plasmodium falciparum*. — Mitt. Österr. Ges. Trop. Med. Par. **17**: 221-228.

WERNSDORFER W.H., CHONGSUPHAJAISIDDHI T. & N.P. SALAZAR (1994): A symposium on containment of mefloquine-resistant falciparum malaria in South-east Asia with special reference to border malaria. — South East Asian J. Trop. Med. Publ. Hlth **25**: 11-18.

WERNSDORFER W.H., LANDGRAF B., KILIMALI V.A. & G. WERNSDORFER (1998): Activity of benflumetol and its enantiomers in fresh isolates of *Plasmodium falciparum* from East Africa. — Acta Tropica **70**: 9-15.

WILKINSON R.N. (1976): Infectivity of falciparum malaria patients for anopheline mosquitoes before and after chloroquine treatment. — Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. **70**: 306-307.

WONGSRICHANALAI C., PICKARD A.L., WERNSDORFER W.H. & S.R. MESHNICK (2002): Epidemiology of drug-resistant malaria. — Lancet Infect. Dis. **2**: 209-218.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (1965): Resistance of malaria parasites to drugs. — WHO Tech. Rep. Ser. No. **296**. WHO, Geneva.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (1973): Chemotherapy of malaria and resistance to antimalarials. — WHO Tech. Rep. Ser. No. **529**. WHO, Geneva.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2001): The use of antimalarial drugs. — Document WHO/CDS/RBM/2001.33. WHO, Geneva.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2002): Monitoring antimalarial drug resistance. — Document WHO/CDS/CSR/EPH/2002.17 WHO/CDS/RBM/2002.39. WHO, Geneva.

Anschrift der Verfasser:

Prof. Dr. Walther H. WERNSDORFER
Abteilung für Spezifische Prophylaxe
und Tropenmedizin
Center für Physiologie und Pathophysiologie der
Medizinischen Universität Wien
Kinderspitalgasse 15
A-1095 Wien, Austria
E-Mail: walter.wernsdorfer@meduniwien.ac.at

Prof. Dr. Gunther WERNSDORFER
Gleiwitzerstr. 49
D-91058 Erlangen, Germany
E-Mail: ea1452@fen.net.de